



<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>C12Q 1/68</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/60156</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 25. November 1999 (25.11.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/01524  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 17. Mai 1999 (17.05.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 23 454.6      18. Mai 1998 (18.05.98)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HEUERMANN, Arno, Svend [DE/DE]; Steegerstrasse 70, D-13359 Berlin (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin-Mitte (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD AND DEVICE FOR PHOTOLITHOGRAPHIC PRODUCTION OF DNA, PNA AND PROTEIN CHIPS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR PHOTOLITHOGRAPHISCHEN HERSTELLUNG VON DNA, PNA UND PROTEIN CHIPS		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>Disclosed is a method for photolithographic production of oligonucleotides on two-dimensional matrices for the production of so-called DNA, PNA or protein chips characterized in that a dynamically controlled liquid crystal mask is used as a photolithographic mask. The invention also relates to a device for implementing said method.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
<p>Beschrieben ist ein Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß man als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Verfahren und Vorrichtung zur photolithographischen Herstellung von DNA, PNA und Protein Chips**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

10 Als DNA-Chips werden Oberflächen bezeichnet, auf denen auf kleinster Fläche eine große Anzahl verschiedener DNA Moleküle fixiert oder synthetisiert werden. Von jedem beliebigen Punkt eines solchen Chips ist in der Regel bekannt, welche DNA sich an diesem befindet. Eine wichtige  
15 Klasse dieser Chips ist dadurch gekennzeichnet, daß kurze Sequenzen, sogenannte Oligonukleotide in situ auf der Chip-Oberfläche synthetisiert werden. Dadurch wird die Zahl der notwendigen chemischen Reaktionsschritte, die  
20 anderenfalls zur Synthese riesiger Zahlen von verschiedenen Sequenzen notwendig wären erheblich eingeschränkt.

DNA-Chips können auf mehrere Arten hergestellt werden. Die einfachste aber teuerste und aufwendigste ist das  
25 Aufbringen vorher synthetisierter Moleküle mittels Pipettieranlagen. Solche Methoden werden in Zukunft wahrscheinlich nicht konkurrenzfähig sein.

Methoden, die sich die oben genannten Vorteile der in Situ Synthese zunutze machen lassen sich in rein chemische  
30 und photolithographische Verfahren unterteilen.

Chemische Verfahren beruhen auf dem Aufbringen der zur Oligonukleotidsynthese notwendigen Lösungen mittels aufwendiger Pipettieranlagen. Daher sind diese zwar einer  
35 konventionellen (nicht in situ) Synthese hinsichtlich Ge-

schwindigkeit und Kosteneffizienz überlegen, können aber bei weitem nicht mit den Möglichkeiten der photolithographischen Synthesen konkurrieren.

5 Für die chemische Synthese von Oligonukleotiden werden Nukleotidbausteine eingesetzt, welche zwei Arten von Schutzgruppen tragen. Einerseits solche Schutzgruppen, die Funktionalitäten der Basen schützen, und andererseits eine anders geartete Schutzgruppe, welche lediglich die Kettenverlängerung um einen einzigen Baustein zuläßt. Die  
10 Abspaltung dieser letzten Schutzgruppe ist wesentlich für die in Situ Synthese. Es müssen an extrem vielen Punkten einer Matrix spezifisch Schutzgruppen quantitativ abgespalten werden, ohne an den anderen Punkten eine solche  
15 Abspaltung zu verursachen. Chemische Methoden stoßen dabei sehr schnell an die Grenze der Auflösung der Pipettiersysteme. Die einzelnen Tropfen, die aufgetragen werden sind zu groß und überlappen ab einer bestimmten Dichte.

20 Daher werden für DNA-Chips hoher Dichte heute photolithographische Synthesewege gewählt. Dabei sind die Schutzgruppen der Nukleotidbausteine photochemisch abspaltbar. Durch Bestrahlung einzelner Punkte der Syntheseoberfläche kann die Kettenverlängerung spezifisch nur an diesen  
25 Punkten ausgelöst werden. Zwei Wege sind gangbar, eine große Auflösung und damit Belegungsdichte auf solchen Oberflächen zu erreichen. Zum einen wird jeder einzelne Punkt einer Oberfläche einzeln mit einem Lichtstrahl -  
30 zum Beispiel einem Laser - angesteuert und so werden die Schutzgruppen der Nukleotidketten nur an den angestrahlten Punkten entschützt. Die notwendige Bestrahlungsdauer ist aber so lang, daß diese Verfahren noch zu Zeitaufwendig sind. Außerdem wird DNA durch Laserbeschuß zerstört.  
35 Die möglicherweise Zehntausende von Punkten müssen nacheinander angesteuert werden. Möglich wären auch komplexe

zum Beispiel Spiegelmechanismen, welche viele Punkte gleichzeitig ansteuern. Solche Vorrichtungen sind aber zur Zeit nicht erhältlich.

- 5 Die zweite und heute gebräuchlichste Methode ist es, Masken zwischen der Chip-Oberfläche und einer Lichtquelle zu installieren. In jedem Syntheseschritt wird so das Licht der Lichtquelle nur an den Punkten zur Chip-Oberfläche durchgelassen, an denen eine Entschützung stattfinden soll. Daher können praktisch beliebig viele Reaktionen parallel durchgeführt werden. Bei vier Nukleotidbausteinen müssen also für eine Verlängerung aller Oligonukleotide um ein Nukleotid vier verschiedene Masken sequentiell über der Oberfläche positioniert werden. Um also eine Länge aller Oligonukleotide von zum Beispiel 30 Nukleotideinheiten zu erreichen müssen 120 Masken hergestellt werden und nacheinander extrem genau über der Oberfläche positioniert werden.
- 20 Je größer die Auflösung des Chips, desto schwieriger ist die Positionierung der Masken über der Oberfläche. Extrem aufwendige Technologie ist dafür erforderlich. Die Herstellungskosten von DNA-Chips liegen daher bei einigen Hunderttausend Mark. Außerdem, je mehr einzelne Punkte auf einem solchen Chip synthetisiert werden sollen, desto aufwendiger wird die Herstellung der Masken. Im Prinzip kann heute ein solcher Chip deswegen nur in eigens konstruierten Fabriken hergestellt werden. Voraussetzung zur Herstellung solcher Chips ist auch die Installation aller dafür notwendigen Geräte in staubfreien Reinräumen. Es besteht aber ein erheblicher Markt an solchen Chips, die von Firmen und Laboratorien auf ad hoc Basis selber entworfen und hergestellt werden könne. Dies verbietet sich nach dem Stand der Technik.

35

Das vorgeschlagene erfindungsgemäße Verfahren soll es ermöglichen in Zukunft auf die Etablierung eigener Fabriken für die Herstellung von DNA und PNA-Chips verzichten zu können. Das Verfahren soll den aufwendigsten Schritt der Chipherstellung, die Herstellung und Positionierung der Masken überflüssig machen. Außerdem soll auf Reinräume verzichtet werden können, die Synthese also in jedem Labor möglich werden.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur schaffen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

15 Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips gelöst, bei dem man als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet.

20

Ferner wird erfindungsgemäße eine Vorrichtung zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips zur Verfügung gestellt, bei der als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske zwischen dem Chip und der Lichtquelle angeordnet ist.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren löst die gestellte Aufgabe auf völlig neuartige Art und Weise durch Kombination kommerziell erhältlicher Komponenten. Im Vergleich zu heute modernen Verfahren verbilligt sich daher die Synthese von DNA- und PNA-Chips um mehrere Größenordnungen. Die Monopolstellung einiger weniger großer Fabriken kann so gebrochen werden und die Herstellung von kostengünstigen DNA-Chips der Allgemeinheit zugänglich gemacht werden.

35

Das grundlegende Konzept des Verfahrens ist die an sich bekannte Tatsache, daß Flüssigkristall-Matrixen als dynamisch ansteuerbare photolithographische Masken verwendet werden können (Bertsch et al., J Photochem. & Photobiol. 107, 275-281 (1997)). Diese Technik ist allerdings noch nie auf dem Gebiet der Synthese von biochemischen Polymeren auf Oberflächen eingesetzt oder diskutiert worden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eliminiert die Notwendigkeit sehr viele verschiedene photolithographische Masken herzustellen. Das erfindungsgemäß Flüssigkristallgitter ist durch aufgedampfte Transistoren an jedem Punkt der Matrix ansteuerbar. Die Auflösung der herzustellenden Chips ist daher nur durch die Zahl der einzeln ansteuerbaren Zellen des Flüssigkristalls abhängig. Jede Maske wird also anstelle einer physikalischen Anordnung von Löchern in einer lichtundurchlässigen Oberfläche durch die rein elektronische Ansteuerung der einzelnen Zellen erreicht. Die Auflösung der Maske - durch die minimale Größe der einzelnen Zellen limitiert - kann dadurch praktisch unendlich gesteigert werden, daß eine größere Flüssigkristallmatrix verwendet wird als der letztendliche Chip. Das Licht, welches durch diese große dynamische Maske fällt kann dann hinter dieser durch optische Linsen auf die Oberfläche teleskopiert werden. Durch diese Technik kann auch der sonst erfolgende Ausbleicheffekt der Flüssigkristalle verhindert werden: Weniger Licht fällt pro Fläche auf die Flüssigkristalle, als hinter dieser für die Entschätzung auf der Chip-Oberfläche benötigt wird.

Anstelle des nach dem Stand der Technik notwendigen Austauschs von Masken nach jedem Syntheseschritt, wird im erfindungsgemäßen Verfahren einfach nur die Ansteuerung des Flüssigkristalls vom Computer geändert. Zwischen den

Entschützungen liegen bei der Synthese chemische Schritte, für welche keine Lichtenergie notwendig ist. Dies findet auch innerhalb der verfahrensgemäßen Vorrichtung statt, ohne daß die Bewegung des Chips oder der Maske  
5 notwendig wäre. Durch die starre Anordnung und extrem präzise Positionierung von Chip, Maske und Lichtquelle, werden mechanische Probleme wie die nach dem Stand der Technik oft notwendige Neupositionierung vermieden. Eine verfahrensgemäße Vorrichtung kann also mechanisch sehr  
10 einfach ausgelegt sein.

Technisch zeichnet sich eine erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch aus, daß Chip-Rohlinge hergestellt werden, welche entweder chemisch aktivierbare Oberflächen (an welche ein  
15 beliebiger Nukleotidbaustein gekoppelt werden kann) aufweisen oder schon mit geschützten, photochemisch abspaltbaren Molekülen belegt sind. Solche Moleküle können zum Beispiel direkt einzelne Nukleotide oder PNA Bausteine darstellen, welche in der Produktion gleichmäßig auf der  
20 Oberfläche angebracht worden sind. Eine wesentliche Eigenschaft dieser Rohlinge ist deren Verpackung. Diese werden unter Reinbedingungen verschmutzungsfrei hergestellt und so verpackt, daß sie auf eine Art und Weise in die Vorrichtung eingeführt werden können, die jeden Kontakt mit einer nicht gefilterten „normalen“ Laborumgebung  
25 ermöglicht. Zum Beispiel kann eine solche Verpackung mit einer durchstoßbaren Folie versiegelt werden. Eine derart verpackter Rohling kann durch eine Dichtung in die Vorrichtung eingeschoben werden, wobei der eigentliche Rohling aus der Verpackung herausgedrückt wird, die Folie durchstößt und dann in der eigentlichen Vorrichtung einrastet (Figur 1). Damit ist die genaue und unverrückbare Positionierung des Rohlings während allen weiteren  
30 Schritten gesichert. Außerdem wird Verschmutzung ausgeschlossen.  
35



Nach dem Einrasten kommt ein solcher Rohling unterhalb der Flüssigkristallmatrix zu liegen. Der Rohling bildet so den Boden, die untere Elektrodenplatte der Flüssigkristallmatrix die Decke eines sehr kleinen Hohlraumes, der auch an den Seiten abgedichtet ist. Über mehrere Zulei-  
5 tungen werden chemische Lösungen in diesen Hohlraum eingeführt und dieser kann auch luft- oder gasgetrocknet werden. Die Decke des Hohlraumes kann aber auch durch eine andere Fläche als direkt einer der Bestandteile der  
10 Flüssigkristallanzeige sein. Zum Beispiel kann dieser aus einem letzten Teil der Optik bestehen, welche das durch die verschiedenen Zellen des Flüssigkristalls durchgelassene Licht fokussieren.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren soll aber auch andere technische Ausführungen einschließen.

Die Flüssigkristallmatrix selber besteht in an sich bekannter Art und Weise aus Flüssigkristallen, welcher zwischen zwei planen Schichten eines solchen Materials eingeschlossen werden, welches für die für die Entschützung wesentlichen Wellenlängen durchlässig ist. Wellenlängen, welche nicht spezifisch zur Photoentschützung beitragen können durch diese Schichten oder andere Teile der Optik  
20 absorbiert werden. Besonders kurzwelliges ultraviolettes Licht wird durch diese Schichten absorbiert. Dieses zerstört DNA. Die eine Schicht Material wirkt dabei auch als Elektrode. Auf die andere Schicht werden in der Art Leitungen gelegt, daß die gesamte Matrix definiert durch  
25 Zellen, die einzeln elektrisch ansteuerbar sind in ein enges Gitter von Punkten unterteilt ist. Elektrische Anregung führt zu einer Ausrichtung der Flüssigkristalle nur an den definierten Punkten. Dort wird dann Licht absorbiert. Andererseits ist es aber auch möglich, das nur  
30 die angeregten Punkte für Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässig werden. Beide Varianten sollen also ge-  
35

schützt werden. Im Prinzip kann die Flüssigkristallmatrix genau die Größe der darunterliegenden Chip-Oberfläche haben. Dann muß Licht mit einem verhältnismäßig parallelen Strahlengang durch eine einfache Lichtquelle auf die Matrix gestrahlt werden. Die Flüssigkristallmatrix kann aber auch beliebig größer sein, als die bestrahlte Oberfläche. In diesem Fall muß zwischen Matrix und Chip eine Optik eingeführt werden, welche das durchscheinende Licht bündelt. Die Vorteile einer solchen Anordnung sind, daß die pro Fläche auf die Matrix einwirkende Energie geringer wird als auf der Chip-Oberfläche. Damit kann der problematische Effekt vermieden werden, welcher bei dauerhafter Bestrahlung die Absorptionsfähigkeit der Flüssigkristalle schmälert. Außerdem kann die Zahl der einzelnen Punkte auf der Chip-Oberfläche praktisch beliebig gesteigert werden (Figur 2).

Die letzte wesentliche Eigenschaft die beschriebenen Verfahrensweise liegt in den Algorithmen, welche zur Ansteuerung des Flüssigkristallmatrix verwendet werden. Eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgelegte Vorrichtung kann von der Eingabe einer oder vieler Sequenzen, welche durch Hybridisierung einer Ziel-DNA mit dem Chip getestet werden sollen, selbständig operieren. Die Datenverarbeitung kann aus den eingegebenen Sequenzen selbständig die zu synthetisierenden Oligonukleotide errechnen und die Abfolge der zu deren Synthese notwendigen Masken berechnen. Diese werden dann, koordiniert mit den verschiedenen chemischen Reaktionsschritten vollautomatisch während der Synthese durch das Muster der in den einzelnen Entschützungs-schritten an die Matrix angelegten Spannungen umgesetzt.

Erfindungsgemäß kann auch ein Detektor (zum Beispiel eine CCD Kamera) in die Vorrichtung eingebaut werden. Diese kann dann nach einer Hybridisierung Signale an den ein-

zelnen Punkten der Chip-Oberfläche registrieren und auswerten.

5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist zum ersten Mal eine Methode geschaffen worden, welche ein billiges und schnelles Synthetisieren von DNA- oder PNA-Chips ermöglicht, deren Belegung mit Sequenzen vom eigentlichen Bediener individuell festgelegt werden kann. Unser Verfahren revolutioniert die Technologie der DNA-Chips von  
10 Grund auf.

Die beigefügten Zeichnungen erläutern die Erfindung:  
Es zeigen:

15 Fig. 1 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in Form einer Arbeitsstation und  
Fig. 2 eine schematische Darstellung einer Detailansicht der erfindungsgemäßen Belichtungsanordnung.

20 In Figur 1 wird in der Bearbeitungsstation 9 der DNA- oder PNA-Chip 4 eingelegt und aus dem Reagenzienspeicher 11 mit den für die Reaktion notwendigen Chemikalien versorgt. Die eigentliche Belichtungsstation besteht aus der Lichtquelle 1 und der LCD-Maske 2. Die übrigen dargestellten Bestandteile, nämlich der Polarisator 3, die Fokussierung 7 und die Sperre 8 dienen der optischen Aufbereitung des Lichts. Mittels des Computer 10 werden alle  
25 Funktionen gesteuert, insbesondere die LCD-Maske 2 entsprechend angesteuert.

30 Figur 2 zeigt eine Detailansicht einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Neben der Lichtquelle 1 ist wiederum die LCD-Maske 2 gezeigt. Unterhalb der LCD-Maske 2 ist der Chip 4 angeordnet. Ferner sind die übrigen optischen Elemente, nämlich ein Diffusor  
35 5, eine Polarisierung 3 und eine Linse 6 dargestellt.

## Bezugszeichenliste

	1	Lichtquelle
	2	LCD-Maske
5	3	Polarisator
	4	Chip
	5	Diffusor
	6	Linse
	7	Fokussierung (Bündelung)
10	8	Sperre
	9	Bearbeitungsstation
	10	Computer
	11	Reagenzienspeicher

15

## Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß man als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet.
- 10 2. Vorrichtung zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske zwischen dem Chip und der Lichtquelle angeordnet ist.
- 15

Fig.1

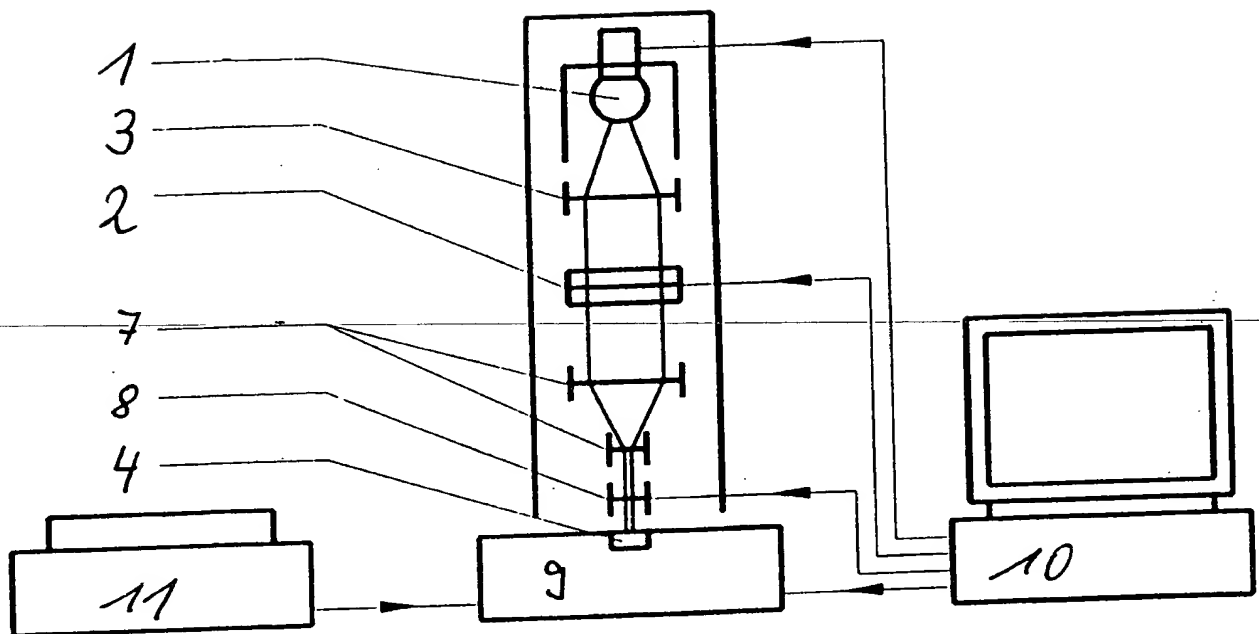
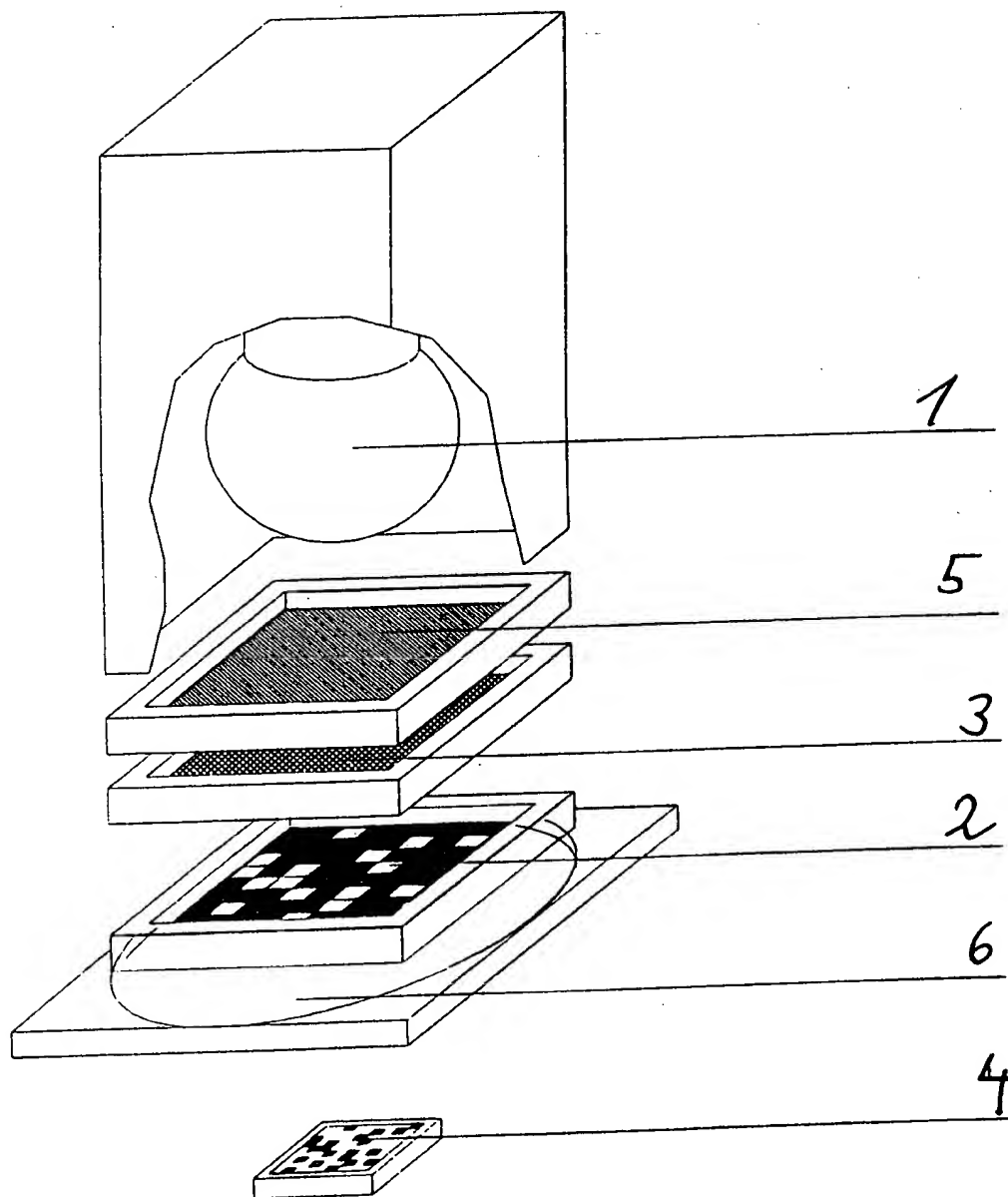


Fig.2





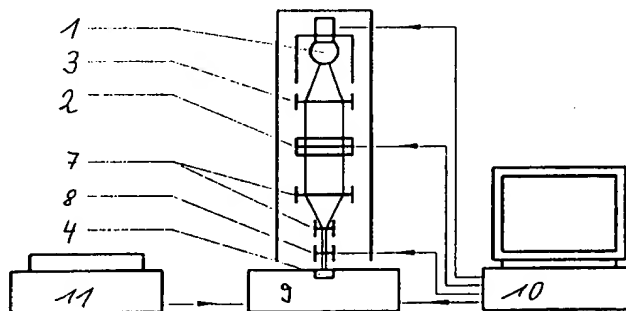


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>B01J 19/00, G03F 7/00</b>		<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/60156</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 25. November 1999 (25.11.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/01524		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 17. Mai 1999 (17.05.99)		<b>Veröffentlicht</b> Mit internationalem Recherchenbericht.	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 23 454.6      18. Mai 1998 (18.05.98)      DE		<b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 17. Februar 2000 (17.02.00)	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HEUERMAN, Arno, Svend [DE/DE]; Steegerstrasse 70, D-13359 Berlin (DE).			
<b>(74) Anwalt:</b> SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin-Mitte (DE).			

**(54) Title:** METHOD AND DEVICE FOR PHOTOLITHOGRAPHIC PRODUCTION OF DNA, PNA AND PROTEIN CHIPS**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR PHOTOLITHOGRAPHISCHEN HERSTELLUNG VON DNA, PNA UND PROTEIN CHIPS**(57) Abstract**

Disclosed is a method and a device for photolithographic production of oligonucleotides on two-dimensional matrices for the production of so-called DNA, PNA or protein chips characterized in that a dynamically controlled liquid crystal mask is used as a photolithographic mask. The invention also relates to a device for implementing said method. In the device according to the invention, the DNA or PNA chip (4) is placed in the processing station (9) and provided with the chemicals required for reaction from the reagent storage (11). The actual exposure station is composed of the light source (1) and the LCD mask (2). The remaining components described, i.e. the polarizer (3), the focussing (7) and the interlock (8), serve to optically process the light. All functions are controlled by the computer (10), especially, the LCD mask (12) is correspondingly controlled.

**(57) Zusammenfassung**

Beschrieben ist ein Verfahren und Vorrichtung zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrizen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA- oder Protein-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß man als photolithographische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. In einer erfindungsgemässen Vorrichtung wird in der Bearbeitungsstation (9) der DNA- oder PNA-Chip (4) eingelegt und aus dem Reagenzienspeicher (11) mit den für die Reaktion notwendigen Chemikalien versorgt. Die eigentliche Belichtungsstation besteht aus der Lichtquelle (1) und der LCD-Maske (2). Die übrigen dargestellten Bestandteile, nämlich der Polarisator (3), die Fokussierung (7) und die Sperre (8) dienen der optischen Aufbereitung des Lichts. Mittels des Computer (10) werden alle Funktionen gesteuert, insbesondere die LCD-Maske (2) entsprechend angesteuert.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No  
PCT/DE 99/01524

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 B01J19/00 G03F7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 B01J G03F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 510 270 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 23 April 1996 (1996-04-23) abstract column 13, line 3 -column 14, line 26 column 15, line 46 -column 16, line 44 figures 1-8A	1,2
X	US 5 424 186 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 13 June 1995 (1995-06-13) abstract column 18, line 25 - line 43 column 35, line 22 - line 59 figure 23	1,2
A	WO 93 02992 A (H & N INSTRUMENTS, INC.) 18 February 1993 (1993-02-18) abstract; figure	1,2
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 1999

Date of mailing of the international search report

06/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

PCT/DE 99/01524

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/01524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5510270 A	23-04-1996	US 5405783 A	11-04-1995
		US 5143854 A	01-09-1992
		US 5744305 A	28-04-1998
		US 5445934 A	29-08-1995
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995
		CA 2054706 A	08-12-1990
		DE 69012119 D	06-10-1994
		DE 69012119 T	22-12-1994
		DE 69032888 D	18-02-1999
		DE 69032888 T	29-07-1999
		DK 476014 T	14-11-1994
		EP 0476014 A	25-03-1992
		EP 0619321 A	12-10-1994
		EP 0902034 A	17-03-1999
		EP 0953835 A	03-11-1999
		ES 2058921 T	01-11-1994
		ES 2129101 T	01-06-1999
		GB 2248840 A,B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 11021293 A	26-01-1999
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5489678 A	06-02-1996
		US 5889165 A	30-03-1999
		US 5753788 A	19-05-1998
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5800992 A	01-09-1998
		US 5902723 A	11-05-1999
		US 5424186 A	13-06-1995
		US 5871928 A	16-02-1999
		US 5527681 A	18-06-1996
		US 5925525 A	20-07-1992
US 5424186 A	13-06-1995	US 5143854 A	01-09-1992
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5527681 A	18-06-1996
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: al Application No

PCT/DE 99/01524

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5424186	A	CA 2054706	A 08-12-1990	
		DE 69012119	D 06-10-1994	
		DE 69012119	T 22-12-1994	
		DE 69032888	D 18-02-1999	
		DE 69032888	T 29-07-1999	
		DK 476014	T 14-11-1994	
		EP 0476014	A 25-03-1992	
		EP 0619321	A 12-10-1994	
		EP 0902034	A 17-03-1999	
		EP 0953835	A 03-11-1999	
		ES 2058921	T 01-11-1994	
		ES 2129101	T 01-06-1999	
		GB 2248840	A, B 22-04-1992	
		HK 61395	A 05-05-1995	
		HK 64195	A 05-05-1995	
		IL 94551	A 30-03-1995	
		JP 11021293	A 26-01-1999	
		JP 4505763	T 08-10-1992	
		KR 9701577	B 11-02-1997	
		KR 9701578	B 11-02-1997	
		WO 9015070	A 13-12-1990	
		NL 191992	B 01-08-1996	
		NL 9022056	T 02-03-1992	
		NO 301233	B 29-09-1997	
		NZ 233886	A 25-02-1993	
		SG 13595	G 16-06-1995	
		US 5744101	A 28-04-1998	
		US 5489678	A 06-02-1996	
		US 5889165	A 30-03-1999	
		US 5753788	A 19-05-1998	
		US 5744305	A 28-04-1998	
		US 5547839	A 20-08-1996	
		US 5800992	A 01-09-1998	
		US 5902723	A 11-05-1999	
		US 5405783	A 11-04-1995	
		US 5871928	A 16-02-1999	
		US 5510270	A 23-04-1996	
		US 5445934	A 29-08-1995	
		AU 663300	B 05-10-1995	
		AU 9153491	A 08-07-1992	
WO 9302992	A	18-02-1993	AU 2422492	A 02-03-1993
			US 5318679	A 07-06-1994
			US 5449754	A 12-09-1995
WO 9941007	A	19-08-1999	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01524

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 B01J19/00 G03F7/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 B01J G03F

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 510 270 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 23. April 1996 (1996-04-23) Zusammenfassung Spalte 13, Zeile 3 - Spalte 14, Zeile 26 Spalte 15, Zeile 46 - Spalte 16, Zeile 44 Abbildungen 1-8A ---	1,2
X	US 5 424 186 A (STEPHEN P.A. FODOR ET AL.) 13. Juni 1995 (1995-06-13) Zusammenfassung Spalte 18, Zeile 25 - Zeile 43 Spalte 35, Zeile 22 - Zeile 59 Abbildung 23 ---	1,2
A	WO 93 02992 A (H & N INSTRUMENTS, INC.) 18. Februar 1993 (1993-02-18) Zusammenfassung; Abbildung --- -/--	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

PCT/DE 99/01524

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interne Aktenzeichen

PCT/DE 99/01524

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5510270 A	23-04-1996	US 5405783 A	11-04-1995
		US 5143854 A	01-09-1992
		US 5744305 A	28-04-1998
		US 5445934 A	29-08-1995
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995
		CA 2054706 A	08-12-1990
		DE 69012119 D	06-10-1994
		DE 69012119 T	22-12-1994
		DE 69032888 D	18-02-1999
		DE 69032888 T	29-07-1999
		DK 476014 T	14-11-1994
		EP 0476014 A	25-03-1992
		EP 0619321 A	12-10-1994
		EP 0902034 A	17-03-1999
		EP 0953835 A	03-11-1999
		ES 2058921 T	01-11-1994
		ES 2129101 T	01-06-1999
		GB 2248840 A,B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 11021293 A	26-01-1999
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5489678 A	06-02-1996
		US 5889165 A	30-03-1999
		US 5753788 A	19-05-1998
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5800992 A	01-09-1998
		US 5902723 A	11-05-1999
		US 5424186 A	13-06-1995
		US 5871928 A	16-02-1999
		US 5527681 A	18-06-1996
		US 5925525 A	20-07-1992
US 5424186 A	13-06-1995	US 5143854 A	01-09-1992
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5527681 A	18-06-1996
		AT 110738 T	15-09-1994
		AT 175421 T	15-01-1999
		AU 651795 B	04-08-1994
		AU 5837190 A	07-01-1991
		AU 672723 B	10-10-1996
		AU 7765594 A	04-05-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichen

PCT/DE 99/01524

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5424186 A		CA 2054706 A	08-12-1990
		DE 69012119 D	06-10-1994
		DE 69012119 T	22-12-1994
		DE 69032888 D	18-02-1999
		DE 69032888 T	29-07-1999
		DK 476014 T	14-11-1994
		EP 0476014 A	25-03-1992
		EP 0619321 A	12-10-1994
		EP 0902034 A	17-03-1999
		EP 0953835 A	03-11-1999
		ES 2058921 T	01-11-1994
		ES 2129101 T	01-06-1999
		GB 2248840 A,B	22-04-1992
		HK 61395 A	05-05-1995
		HK 64195 A	05-05-1995
		IL 94551 A	30-03-1995
		JP 11021293 A	26-01-1999
		JP 4505763 T	08-10-1992
		KR 9701577 B	11-02-1997
		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SG 13595 G	16-06-1995
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5489678 A	06-02-1996
		US 5889165 A	30-03-1999
		US 5753788 A	19-05-1998
		US 5744305 A	28-04-1998
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5800992 A	01-09-1998
		US 5902723 A	11-05-1999
		US 5405783 A	11-04-1995
		US 5871928 A	16-02-1999
		US 5510270 A	23-04-1996
		US 5445934 A	29-08-1995
		AU 663300 B	05-10-1995
		AU 9153491 A	08-07-1992
WO 9302992 A	18-02-1993	AU 2422492 A	02-03-1993
		US 5318679 A	07-06-1994
		US 5449754 A	12-09-1995
WO 9941007 A	19-08-1999	KEINE	